1 回の注入からの、フルスキャン、SIM、μECD、FPD 同時検出による農薬の同定

アプリケーション

食品安全性、環境

著者

Chin-Kai Meng and Bruce Quimby
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

このアプリケーションノートでは、1回の注入から 4 つまでのシグナルを取得できるガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS)システムについて説明します。三方マイクロ流体スプリッタをカラム出口に接続した場合、1 回の注入で、MS データに加えさらに 2 つのGC 検出器シグナルを取得できます。このマルチシグナル構成により、ライブラリ検索に使用するフルスキャンスペクトル、微量分析用の選択イオンモニタリング(SIM)シグナル、複雑なマトリックスから優れた選択性および感度が得られるマイクロ電子捕獲検出器や炎光光度検出器シグナルが得られます。元素選択性検出器、SIM/Scan、デコンボリューションレポート作成ソフトウェアを組み合わせることにより、非常に強力な農薬分析システムとなります。本報では微量成分の定量/確認やスクリーニング分析を例にして説明します。

はじめに

世界中の多くの分析機関では、人類の健康を守るために、食品および環境における残留農薬レベルを分析しています。通常の分析プロセスには、サンプルの均一化、農薬の抽出操作が含まれ、化合物の性質に応じて、ガスクロマトグラフ(GC)または液体クロマトグラフ(LC)を使用してターゲット化合物を測定します。GC での分析に適している化合物の場合、優れた感度および選択性を得られる検出器として、NPD (窒素・リン検出器)、μECD (マイクロ電子捕捉検出器)、および FPD (炎光光度検出器) が使われてきました。しかし、デュアルカラムによる確認分析を用いたとしても、これらの GC 検出器だけでは、高い信頼性で化合物を同定することはできません。

最終的に化合物を確証するには、通常、フルスキャンのマススペクトルを取得して、それをライブラリ検索に掛けます。しかし、フルスキャン分析の検出下限(DL)は、GC の選択性検出器よりも高いため、より低い DL が必要とされる場合は、選択イオンモニタリング(SIM)法を使用します。SIM では、ターゲット化合物がカラムから溶出するリテンションタイム(RT)の時間範囲で、各ターゲット化合物に特徴的なイオンだけをモニターします。少数の特定イオンだけをモニターすることにより S/N 比が大幅に向上します。モニターするイオンは、ターゲット化合物の RT に対応するグループにしてタイムプログラムします。近接して溶出する複数のターゲット化合物を含む SIM 分析では、それぞれのピークの RT に合わせて SIM グループのタイムプログラムを、正確に位置合わせする必要があります。リテンションタイムロッキング(RTL)を適用すると、カラムのメンテナンスや交換後に SIM グループのタイムウィンドウを調整する必要がなくなります。

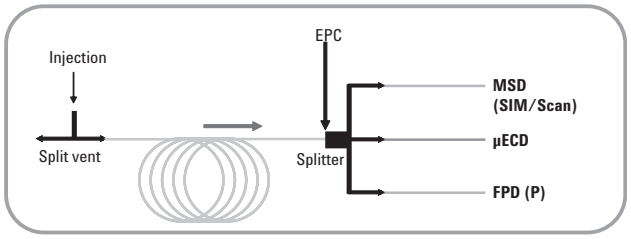
このアプリケーションノートでは、1 回の注入から 4 つまでのシグナルを取得できる GC/MS システムについて説明します。マルチシグナル検出のメリットは、次のとおりです。

- 化合物確証用の情報 — ライブラリ検索に使用するフルスキャンデータ

- 最高の感度 — 微量検出を可能にする SIM データ
- 優れた選択性 — 複雑なマトリックスから微量のヘテロ化合物を検出できる μECD と FPD

実験方法

最近の技術概要では、5975 inert MSD のパフォーマンスエレクトロニクスを活用して、性能を損なうことなく、1 回の測定で SIM シグナルおよびフルスキャンシグナルを取得する“SIM/Scan 同時データ取り込み”について説明しています [1]。ケミステーションの AutoSIM ツールを使用することによって、SIM メソッドを簡単に自動的に開発できます [2]。メソッドのチェックボックスを選択するだけで、SIM およびフルスキャンデータを同時に取得できます。その代わりに、1 秒あたりの取り込みサイクル数は若干少なくなりますが、1回の分析の中にシグナル（フルスキャンデータまたは SIM データ）を追加して取り込むことができます。たとえば、適切な取得パラメータを指定すれば、スキャンスピードの増加や1 秒あたりのサイクル数の減少は、通常の場合、深刻な問題ではなく、ピークの定量や分析結果の品質（S/N など）には影響を及ぼしません。



カラム出口からの溶出ガスは、接続したキャピラリチューブ（リストリクタ）の長さと内径に応じて、三方向へ分配されます。

図1.　マルチシグナル構成の流路図。
注:スプリッタでカラム流量に Aux EPC流量が追加されています。

SIM/Scan データに加え、ケミステーションソフトウェアでは、さらに 2 つまでの GC 検出器シグナルを同時に取得できます。たとえば、FPD（リンまたは硫黄モード）と NPD（窒素・リン検出器）シグナル、またはデュアル波長 FPD（DFPD）による P シグナルと S シグナルなどです。図 1 を参照してください。

図 1 はマルチシグナル検出の流路図です。カラム出口に三方マイクロ流体スプリッタを取り付けて、カラムからの溶出を別々の検出器へ分岐しました [3]。本研究では、FPD と μECD を 1 基ずつ取り付けています。図の中で、補助 EPC（Aux EPC）ガスチャネルがスプリッタに接続され、カラム出口での圧力を維持していることに注目してください。これにより、スプリット比/流量が分析の始めから終わりまで一定に保たれます。図 2 は GC オーブンに取り付けたマイクロ流体スプリッタの拡大写真です。

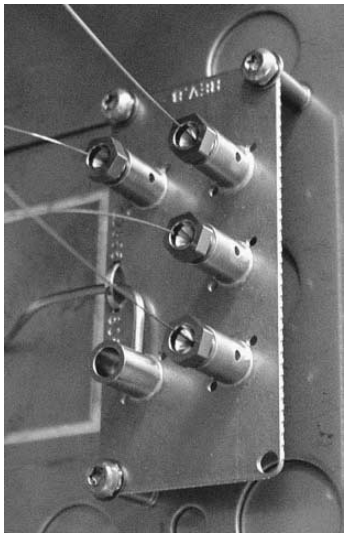


図2.　6890 GC オーブンに取り付けられたマイクロ流体三方スプリッタの拡大写真

マイクロ流体プレートのサイズは、幅 3.2 cm、高さ 6.4 cm です。このデバイスは、過大な熱容量、過剰な死容積、およびオーブン昇温の繰り返しにより接続部が漏れやすくなるなど、よくありがちな問題を避けて設計されました。スプリッタの流路および接続部は、フォトリソグラフィおよび化学切削技術を用いて、薄いステンレスのプレート上に刻まれ配置されています。プレートには拡散接合により、カラムコネクタが取り付けられ、さらに表面を不活性化処理して、コンパクトな一体型のマイクロ流体スプリッタにまとめられています。コネクタには金属製フェラルを使用しており、昇温を繰り返してもリークせず、溶媒やサンプルマトリックスを吸着するおそれもないため、微量分析アプリケーションにおいて感度が改善されます。

スプリッタと各検出器の間は不活性化処理したキャピラリチューブで接続しており、これは流量リストリクタとしても機能します。Aux EPC 圧力とリストリクタの長さは、スプレッドシート風の電卓プログラムを使用して決定し、すべての検出器に対して適切なスプリット比が得られます。三方スプリッタは、コネクタにキャップをするだけで、簡単に 二方スプリッタに変更できます。

このスプリッタのその他の利点には、バックフラッシュ [3] やクイック交換などがあります。Aux EPC 流量をランタイムプログラムして圧力を上げ、同時に注入口圧力を大気圧付近まで下げます。これにより、カラムフローが逆流し、カラムに残っている難揮発性物質は注入口のスプリットベントから排出されます。また、スプリッタの Aux EPC を利用して、MSD を冷却したり大気開放しないで、カラムの交換や注入口のメンテナンスを実施できます。このような場合、カラムフィッティングを取り外しても、スプリッタの流路や接続部は、Aux EPC からのヘリウムガスがフィッ

ティング部をパージして、スプリッタや MSD に空気が入らないようにデザインされています。ハードウェアの詳細および設定については表 1 を参照してください。

表1.　ガスクロマトグラフ、質量分析計および三方スプリッタの操作パラメータ

GC	Agilent Technologies 6890		
注入口	EPCスプリット/スプリットレス		
モード	スプリットレス、注入量1.0 µL（7683 ALS）		
注入口温度	280 °C		
圧力	～27 psi（クロルピリホス-メチルのRTは16.596 minにロック）		
パージ流量	50.0 mL/min		
パージ時間	0.75 min		
トータル流量	55.3 mL/min		
ガスセーバ	OFF		
ガス種類	ヘリウム		
注入口ライナー	Siltek Cyclosplitter、内径4 mm、Restek p/n 20706-214.1		
オーブン			
オーブン昇温	°C/min	最終（°C）	ホールド時間（min）
開始		70	2.00
昇温1	25	150	0.00
昇温2	3	200	0.00
昇温3	8	280	15
トータル分析時間		46.87 min（最後の標準化合物は35 min付近で溶出）	
平衡時間		0.5 min	
オーブン最高温度		325°C	
カラム		Agilent Technologies HP 5-ms、p/n 19091S-433	
長さ		30.0 m	
内径		0.25 mm	
膜厚		0.25 µm	
モード		定圧力	
初期流量		2.5 mL/min	
出口		未確定	
出口圧力		3.8 psi（スプリッタへの Aux EPC圧力）	

フロント検出器（FPD）

リンモード		**硫黄モード**	
水素流量:	75.0 mL/min	水素流量:	50.0 mL/min
助燃ガス流量:	100.0 mL/min	助燃ガス流量:	60.0 mL/min
温度:	250°C		
助燃ガス種類:	空気		
モード:	一定メイクアップ流量		
メイクアップ流量:	60.0 mL/min		
メイクアップガス種類:	窒素		
点火オフセット:	2.00		
データレート:	5 Hz		

表1.　ガスクロマトグラフ、質量分析計および三方スプリッタの操作パラメータ（続き）

バック検出器（μECD）	
温度:	300°C
モード:	一定メイクアップ流量
メイクアップ流量:	60.0 mL/min
メイクアップガス種類:	窒素
データレート:	5 Hz
サーマルAUX 2	
使用:	MSDトランスファラインヒーター
初期温度:	280°C
圧力AUX 5	
ガスタイプ:	ヘリウム
初期圧力:	3.80 psi
初期時間:	0.00 min（この値はオーブン昇温に依存）
MSD	Agilent Technologies 5975 inert MSD
チューンファイル	Atune.U
モード	スキャン
溶媒ディレイ時間	3.00 min
EM電圧	Atune電圧
低マス	45 amu
高マス	555 amu
スレッショルド	100
サンプリング	2
A/D サンプル	4
スキャン/秒	2.89
四重極温度	150°C
イオン源温度	230°C
三方スプリッタ	Agilent 6890N Option 890、工場出荷時にGCに取り付け済み
スプリット比	10:10:1 MSD:FPD: μECD
MSD リストリクタ	1.444 m×0.18 mm（内径）不活性化済みヒューズド・シリカチューブ
FPD リストリクタ	0.532 m×0.18 mm（内径）不活性化済みヒューズド・シリカチューブ
μECD リストリクタ	0.507 m×0.10 mm（内径）不活性化済みヒューズド・シリカチューブ
MSD への流量（280°C）	1.53 mL/min
FPD への流量（280°C）	1.53 mL/min
μECD への流量（280°C）	0.153 mL/min
メイクアップ流量（280°C）	1.38 mL/min

本アプリケーションノートで使用したソフトウェア

GC/MSD ChemStation	G1701DA
Deconvolution Reporting ソフトウェア（DRS）	G1716AA
NIST ライブラリ	G1033A
AMDIS（NIST ライブラリ CD に標準で同梱）	

結果と考察

図 3 は、農薬標準品混合試料を 1 回注入して同時に取得した 4 つのシグナルを示しています。μECD の感度が高いため、3 つの検出器のスプリット比は MSD:FPD:μECD = 10:10:1 に設定しました。このスプリット比により、各化合物 1 ppm (1000 pg/μL) を含む試料を 1μL スプリットレス注入し、図 3 にラベルした濃度でそれぞれの検出器へ分配します。

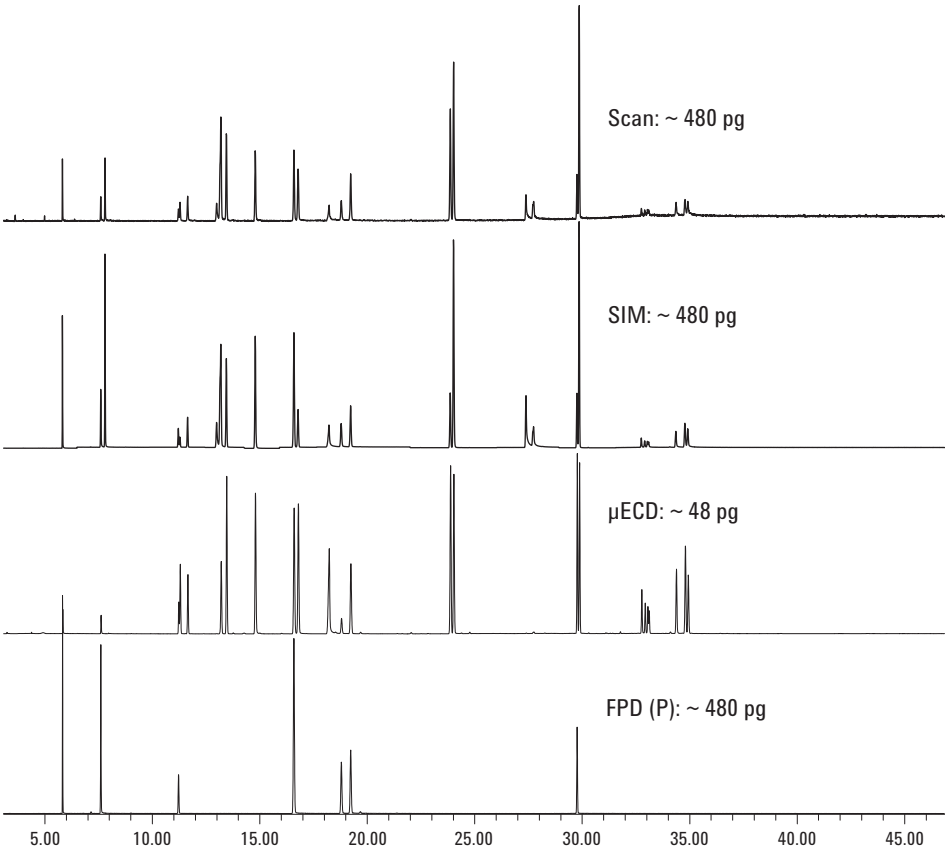


図3.　1 ppm 標準品を 1 μLスプリットレス注入して、同時に取得したシグナル。検出器側のスプリット比はMSD:FPD:μECD = 10:10:1。

図 4 は、農薬の標準品を農作物マトリックスで 100 倍に希釈した場合のシグナルを示します。フルスキャンからのトータルイオンクロマトグラム（TIC）は、感度が不足しているため示していません。FPD（P）と μECD では、この抽出液にスパイクした農薬がすべて検出されました。微量なターゲット化合物を分析する場合、SIM シグナルを使用して定量し、GC シグナルを使用してそれを確証することができます。

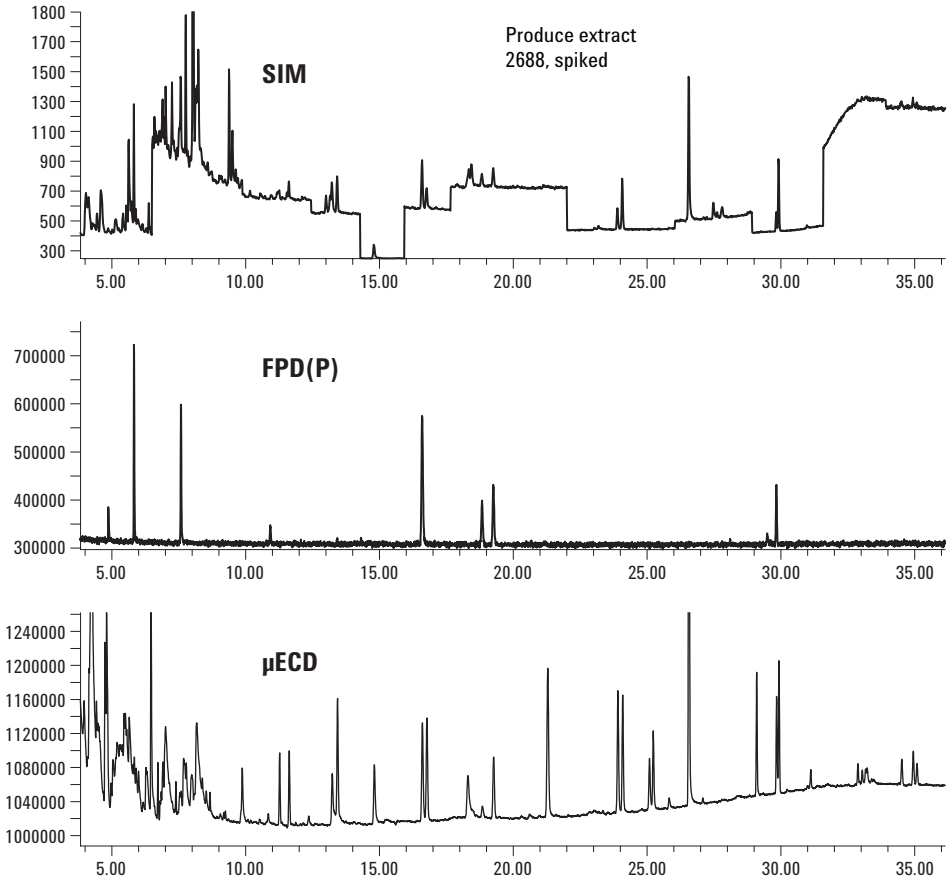


図4.　10 ppbでスパイクされた農作物抽出液のデータ。
FPD および μECDでは、抽出液にスパイクされた各標準品を検出できました。

このマルチシグナルシステムは、スクリーニング分析にも応用できます。スクリーニング分析では、あらかじめターゲットリストが得られないため、SIM 取得や MS/MS は不可能です。図 5 は、農作物抽出液からの 3 つのシグナル（SIM を除く）を示しています。

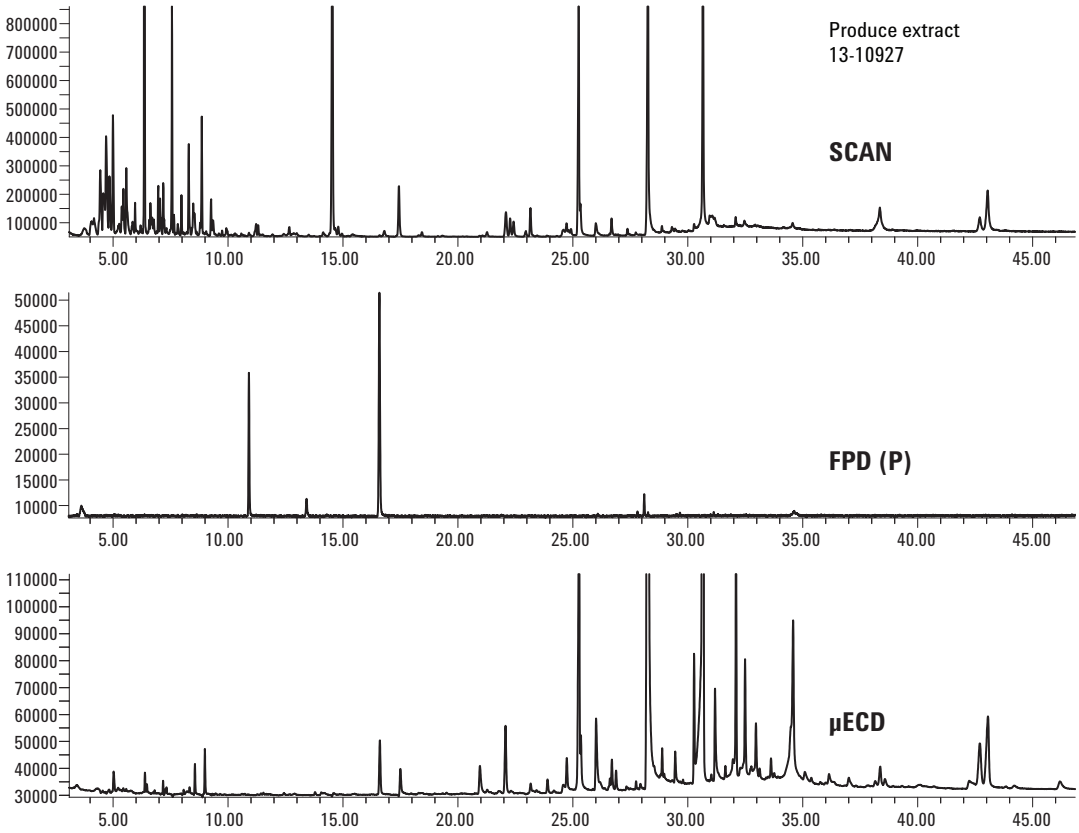
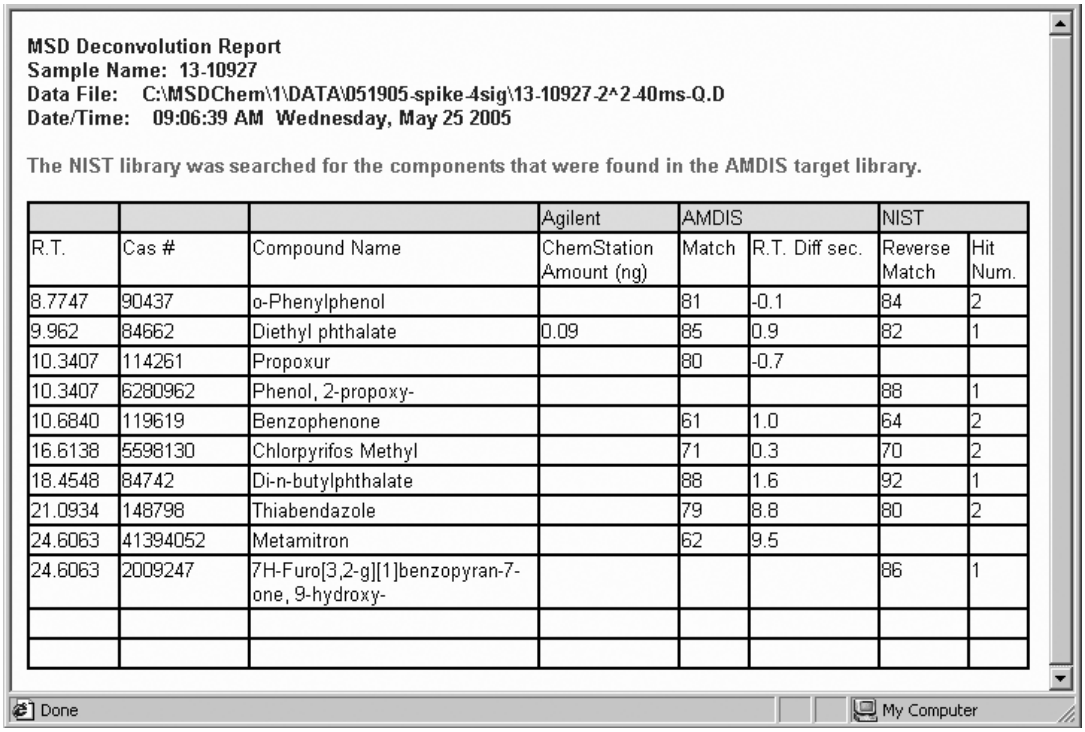


図5.　抽出液 13-10927 のフルスキャン、FPD (P)、および µECD データ。

図 6 のように、デコンボリューションレポート作成ソフトウェア（DRS）[3, 4] によって、TIC でいくつかの農薬候補が発見されました。



MSD Deconvolution Report
Sample Name: 13-10927
Data File: C:\MSDChem\1\DATA\051905-spike-4sig\13-10927-2^2-40ms-Q.D
Date/Time: 09:06:39 AM Wednesday, May 25 2005

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

			Agilent	AMDIS		NIST	
R.T.	Cas #	Compound Name	ChemStation Amount (ng)	Match	R.T. Diff sec.	Reverse Match	Hit Num.
8.7747	90437	o-Phenylphenol		81	-0.1	84	2
9.962	84662	Diethyl phthalate	0.09	85	0.9	82	1
10.3407	114261	Propoxur		80	-0.7		
10.3407	6280962	Phenol, 2-propoxy-				88	1
10.6840	119619	Benzophenone		61	1.0	64	2
16.6138	5598130	Chlorpyrifos Methyl		71	0.3	70	2
18.4548	84742	Di-n-butylphthalate		88	1.6	92	1
21.0934	148798	Thiabendazole		79	8.8	80	2
24.6063	41394052	Metamitron		62	9.5		
24.6063	2009247	7H-Furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one, 9-hydroxy-				86	1

Done My Computer

図6. DRS によって作成された抽出液 13-10927 のレポート。

サンプルで考えられる農薬は、ベンゾフェノン、クロルピリホス-メチル、チアベンダゾールでした。プロポクスルおよびメタミトロンは、AMDIS および NIST の両方で確認されませんでした。従って、これらは殆ど偽陽性と考えられます。

サンプルマトリックスの複雑さおよびその他の干渉により、バックグラウンド減算を行った後でも、TIC のピークからライブラリの高い一致度を得ることは難しい場合があります。このため、化合物の確認をサポートする情報を提供するという点で、元素選択性検出器は非常に有益です。マルチシグナルシステムではリテンションタイムロッキング（RTL）を使用しました。これにより、RT と、FPD（P）および μECD のレスポンスから位置合わせしたピークで、クロルピリホス - メチル（$C_7H_7Cl_3NO_3PS$）と確認しました。

通常、FPD 光電子増倍管の電源を切り、P フィルターを S フィルターに交換して、光電子増倍管の電源を再投入するのにかかる時間は 3 分未満です。交換後は検出器のガス流量を調節して、P または S モードにレスポンスを最適化します。FPD (S) モードで同じ抽出液を新しく注入しました。FPD (S) の結果とその前に取得したシグナル (SCAN および FPD (P)) を一緒にして図 7 に示します。2 つの主要なピークが FPD (S) のクロマトグラムに見受けられます。ピークの RT からも、それぞれクロルピリホス-メチルとチアベンダゾール ($C_{10}H_7N_3S$) であることが裏付けられました。フルスキャン TIC では、どちらの化合物のピークも殆ど認識できない点に注目してください。従来のデータ解析ではどちらの化合物も同定することは出来ません。FPD (S) モードは高い選択性を持ちますが、FPD (P) モードほど感度は高くありません。μECD は非常に高感度ですが、FPD ほど選択性はありません。それぞれの GC 検出器、SIM/Scan、および DRS を組み合わせることにより、非常に強力な農薬分析システムを構築できます。

結論

同時 SIM/スキャンを利用すると、ユーザは、1 回の分析で微量レベルの SIM データに加えライブラリで検索可能なフルスキャンスペクトルも得ることができます。三方マイクロ流体スプリッタをカラム出口に接続した場合、1 回の注入で、MS データに加えさらに 2 つのシグナルを元素選択性検出器から取得できます。この機器構成は、食品または環境サンプルの微量な残留農薬の分析にとって非常に魅力的です。

このマルチシグナルコンフィグレーションにより、ライブラリ検索用のフルスキャンスペクトル、微量分析用の SIM シグナル、複雑なマトリックスから優れた選択性と感度を得るための μECD および FPD シグナルが得られます。本アプリケーションノートでは、微量な化合物を定量、確認またはスクリーニングするために、1 回の注入から SIM/Scan データと同時に、μECD シグナルと FPD シグナル (P または S モード) を取得した分析例を示しました。

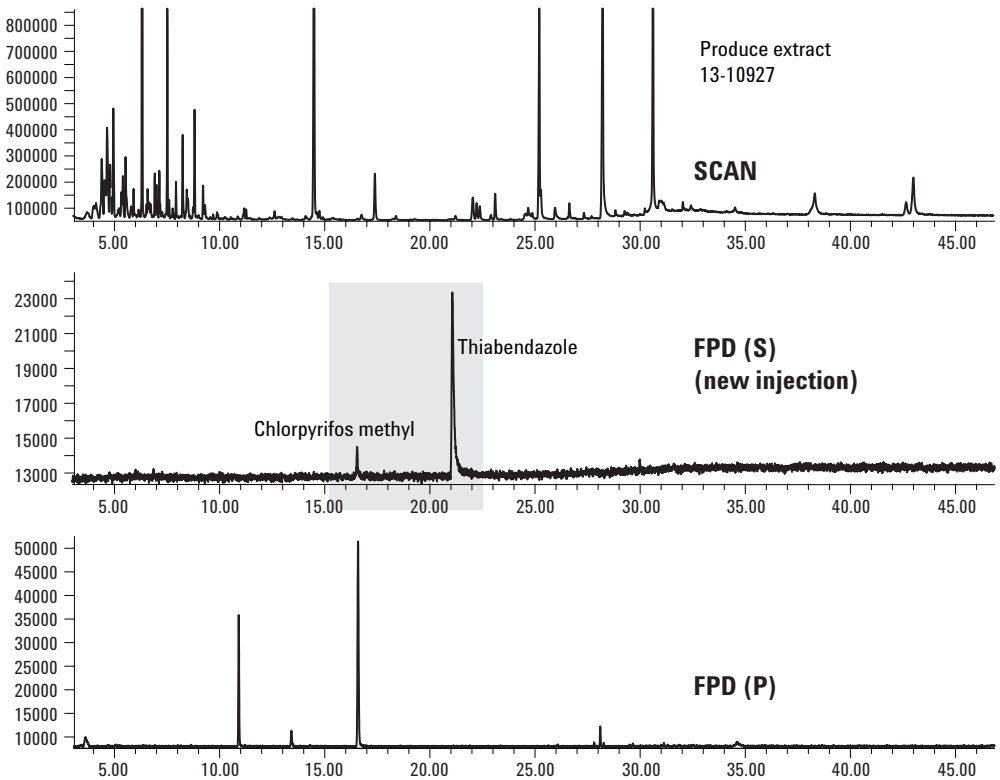


図7.　抽出液13-10927のフルスキャン、FPD (S)、およびFPD (P) データ。

参照文献

1. Chin-Kai Meng, "Improving Productivity with Synchronous SIM/Scan"（同時 SIM/Scan を利用した生産性の向上）, Agilent Technologies, publication 5989-3108JAJP, www.agilent.com/chem
2. Harry Prest and David W. Peterson, "New Approaches to the Development of GC/MS Selected Ion Monitoring Acquisition and Quantitation Methods", Agilent Technologies, publication 5988-4188, www.agilent.com/chem
3. Michael J. Szelewski and Bruce Quimby, "New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples"（高マトリックス試料の残留農薬を高速分析するための新しいツール）, Agilent Technologies, publication 5989-1716JAJP, www.agilent.com/chem
4. Philip L. Wylie, Michael J. Szelewski, Chin-Kai Meng, and Christopher P. Sandy, "Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD Using Deconvolution Reporting Software"（DRS を使用した GC/MSD による農薬スクリーニング）, Agilent Technologies, publication 5989-1157JAJP, www.agilent.com/chem

さらに詳しい情報

弊社製品とサービスについてさらに詳しい情報をご希望のお客様は、弊社ウェブサイト（www.agilent.com/chem/jp）をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilentは、この文書に含まれる誤り、および本文書の内容または使用に関連して、付随的または間接的に引き起こされる損害について、一切の責任を負いません。
ここに記載されている情報、内容および仕様は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA
July 6, 2005
5989-3299JAJP

Agilent Technologies